

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) **Patentschrift**
(11) **DE 2537013 C2**

(51) Int. Cl. 4:
G01N 1/28

(21) Aktenzeichen: P 25 37 013.2-52
(22) Anmeldetag: 20. 8. 75
(41) Offenlegungstag: 24. 6. 76
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 24. 9. 87

US PAT

3932,222

Innenhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

(30) Unionspriorität: (32) (33) (31)
20.12.74 US 535148

(73) Patentinhaber:
J.K. and Susie L. Wadley Research Institute and
Blood Bank, Dallas, Tex., US

(74) Vertreter:
Frhr. von Uexküll, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Graf zu
Stolberg-Wernigerode, U., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Suchantke, J., Dipl.-Ing., Pat.-Anw., 2000 Hamburg

(72) Erfinder:
Dorn, Gordon Lee, Dallas, Tex., US

(56) Im Prüfungsverfahren entgegengehaltene
Druckschriften nach § 44 PatG:

DE-OS 24 55 981
DE-OS 24 06 362
DE-OS 23 58 493
DE-OS 21 24 445
US 25 90 900

(54) Gerät zum Mischen von Flüssigkeiten

DE 2537013 C2

1. Gerät zum Mischen von Flüssigkeiten mit einem zwei Endteile und einem evakuierten Innenraum (24) mit Filtermedium (22) aufweisenden, geschlossenen Behälter (12), mit einem eines der Endteile dicht verschließenden, durchstechbaren Verschlußstück (16) und mit einem Behandlungsflüssigkeit (18) enthaltenden Raum (16a) im Verschlußstück (16), der gegenüber dem Innenraum (24) durch eine Membran (20) getrennt ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran (20) eine dünne, gespannte elastomere Folie ist, die beim Durchstechen mit einer Nadel zerburst.

2. Gerät nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das durchstechbare Verschlußstück einen rohrförmigen Ansatz (16a) aufweist, der in Endteil des geschlossenen Behälters (12) eingesetzt ist und eine durchstechbare Verstärkung (16b) aufweist, die das äußere Ende des rohrförmigen Ansatzes (16a) verschließt, und daß das innere Ende des rohrförmigen Ansatzes (16a) in dem Behälter (12) mit der elastomeren Folie überspannt ist und dadurch im rohrförmigen Ansatz (16a) die Behandlungsflüssigkeitskammer bildet.

3. Gerät nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran (20) die Seitenwände des durchstechbaren Verschlußstückes (16) überlappt.

4. Gerät nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die elastomere Folie straff gespannt ist.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Gerät zum Mischen von Flüssigkeiten gemäß Oberbegriff des Patentanspruchs 1.

Aus der US-PS 25 90 900 ist eine Ampulle mit Verschlüssen bekannt, von denen einer aus einem Kolben besteht, der eine Schneidvorrichtung mit einem Raum für Arzneimittel aufweist. Wird zum Zwecke der Injektion der Verschluß mit der Druckstange einer Injektionsnadel in die Ampulle gepreßt, so wird dadurch die über den Kolben vorstehende Schneidvorrichtung in den Kolben gedrückt und zerschneidet dessen auf der Innenseite der Ampulle liegende Begrenzungswand. Dadurch werden im Raum der Schneidvorrichtung untergebrachte Arzneimittel in das Innere der Ampulle freigegeben. Der Verschluß aus Kolben und Schneidvorrichtung ist nicht durchstechbar, so daß eine zu untersuchende Probe von der anderen Seite her in die Ampulle eingebracht werden muß. Die Probe wird dadurch nicht intensiv genug mit dem in dem Raum der Schneidvorrichtung untergebrachten Arzneimittel gemischt, so daß Untersuchungsergebnisse verfälscht werden.

Aus der DE-OS 23 58 493 ist ein Behälter zum Aufbewahren von Blut bekannt, der mit einer Schließvorrichtung und einem Verschlußelement versehen ist. Während die Schließvorrichtung den Behälter nach außen abschließt, ist das von der Schließvorrichtung getrennte Verschlußelement im Behälter angeordnet. Der Zwischenraum zwischen diesen Teilen wird gegenüber dem Inneren des Behälters durch das Verschlußelement nicht abgedichtet, sondern es soll vielmehr an den Seitenwänden durchlässig sein, um Plasma durchtreten zu lassen.

In der DE-OS 24 55 981 wird eine Vorrichtung zur Feststellung von pathogenen Mikroben vorgeschlagen, die ein Zentrifugierrörchen und zwei als Endverschlüsse dienende Durchstechkappen aufweist. Das obere Ende der oberen Durchstechkappe wird von einer mit Innenring ausgestatteten Kappe umschlossen, so daß eine Endkammer entsteht. Die Kappe ist innen mit einer Hohlnadel versehen; wird sie fest auf das Zentrifugierrörchen aufgeschraubt, dann dringt ihre Hohlnadel 10 durch die obere Durchstechkappe. Letztere bleibt bis auf die Punktionsstelle unversehrt. In der Endkammer untergebrachte Behandlungsflüssigkeit kann also nur durch die spezielle, mit einer seitlichen Öffnung versehene Hohlnadel aus der Endkammer abfließen. Wird die 15 Kappe zurückgeschraubt, schließt sich die Punktionsstelle, so daß keine weitere Flüssigkeit austreten kann.

Aus der DE-OS 24 06 362 ist ein Verfahren zum Feststellen von pathogenen Mikroben bekannt, bei dem allerdings die Blutprobe vor dem Einbringen in das Zentrifugierrörchen mit einem Lösungsmittel vermischt werden muß. Dadurch besteht die Gefahr einer Verunreinigung der Probe.

Schließlich ist aus der DE-OS 21 24 445 eine Elektrodenanordnung bekannt, die sich beispielsweise für Messungen im Strömungsverlauf eines Gährungsprozesses eignet. Hierzu besitzt sie einen langgestreckten, rohrförmigen Tragkörper mit einer semi-permeablen Membran, welche eine Kammer für die Aufnahme einer Elektrolytlösung bildet.

30 Es ist Aufgabe der Erfindung, ein Gerät zum Mischen und Zentrifugieren insbesondere für mikrobiologische Analysen zu schaffen, welches die Zumischung eines Behandlungsfluids zu einer Analysenprobe und das nachfolgende Ablegen der Mischung auf einem dritten Fluid gestattet, ohne daß eine Vermischung der beiden letzteren erfolgt.

Zur Lösung dieser Aufgabe dienen bei einem Gerät gemäß Patentanspruch 1 dessen kennzeichnende Merkmale.

40 Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Anhand der beigefügten Zeichnung wird das erfindungsgemäße Gerät beispielsweise noch näher beschrieben. Es zeigt

45 Fig. 1 einen Schnitt durch eine bevorzugte Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Misch- und Zentrifugiergerätes und

Fig. 2 bis 8 schematische Darstellungen, in denen das Verfahren zum Auffinden von pathogenen Mikroorganismen unter Verwendung des Gerätes gemäß Fig. 1 bildlich veranschaulicht ist.

Das in Fig. 1 im Schnitt gezeigte erfindungsgemäße Misch- und Zentrifugiergerät 10 weist einen länglichen rohrförmigen Zentrifugierbehälter 12 auf, der an seinem unteren Ende mit einem durchstechbaren Verschlußstück 14 und an seinem oberen Ende mit einem durchstechbaren Verschlußstück 16 dicht verschlossen ist.

Der Zentrifugierbehälter kann aus Glas oder Hartkunststoff, wie beispielsweise Polycarbonat oder Polypropylen gefertigt sein. Die einpreßbaren bzw. durchstechbaren Verschlußstücke 14 und 16 können selbstabdichtende Gummistopfen sein. Am vorderen Ende des Verschlußstückes 14 ist ein kegelstumpfförmig verjüngter Ansatz 14a vorhanden. Eine durchstoßbare Verstärkung 14b bildet den Boden des kegelstumpfförmig verjüngten Ansatzes 14a. An dem vorderen Ende des durchstechbaren Verschlußstückes 16 ist ein Ansatz 16a vorhanden. Die durchstechbare Verstärkung 16b hat

vorzugsweise eine größere Dicke als die durchstechbare Verstärkung 14b. Dies wird im einzelnen nachstehend im Zusammenhang mit der Beschreibung der Fig. 2 bis 8 erläutert.

Der Ansatz 16a des durchstechbaren Verschlußstückes 16 dient als Aufnahmerraum für die Behandlungsflüssigkeitsprobe und enthält eine Probe 18 solcher Behandlungsflüssigkeitsprobe. Die Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 wird mittels einer dünnen zerreibbaren Membran 20 in dem Ansatz 16a zurückgehalten. Die zerreibbare Membran 20 besteht aus einem dünnen elastomeren Material, beispielsweise aus Naturgummi oder synthetischem Gummi, das über die Öffnung des Ansatzes 16a gezogen ist. Wie aus Fig. 1 zu ersehen, ist die zerreibbare Membran 20 über die Öffnung des Ansatzes 16a gespannt und ist so groß bemessen, daß sie an den Seitenwänden des durchstechbaren Verschlußstückes 16 Überlappungen 20a auszubilden vermag. Die Überlappung 20a ist zwischen der Außenwandung des durchstechbaren Verschlußstückes 16 und der Innenwandung des rohrförmigen Zentrifugierbehälters 12 eingepaßt. Die zerreibbare Membran 20 kann zweckmäßig eine etwa der Dicke von Spielzeugballon-Hüllen entsprechende Stärke haben. Im allgemeinen ist die zerreibbare Membran 20 aus irgendeinem geeigneten Material gefertigt, mit dem sich die Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 wirksam von dem im Inneren gelegenen evakuierten Raum 24 abtrennen läßt, das jedoch splittert, zerbricht, zerteilt werden kann oder sonstwie die abdichtende Konfiguration über der Öffnung des Ansatzes 16a verliert, wenn man es mit einem scharfen Gegenstand, beispielsweise einer hypodermischen Nadel, durchsticht, so daß die Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 in den evakuierten Raum 24 hineinfließen kann. Dementsprechend ist im allgemeinen bevorzugt als zerreibbare Membran 20 ein dünnes elastomeres Material, das sich stramm spannen läßt, vorhanden.

Der sterile Inhalt des Zentrifugierbehälters 12 besteht aus einem flüssigen Filtermedium 22 und einem evakuierten Raum 24, der vollständig oder teilweise evakuiert sein kann. Der Druck in dem evakuierten Raum 24 liegt niedriger als der atmosphärische Druck und wird auf einem solchen vorbestimmten Wert gehalten, daß der Zentrifugierbehälter eine bekannte Menge Flüssigkeit durch Injektion durch das durchstechbare Verschlußstück 16 hindurch aufzunehmen vermag, ohne daß sich im Inneren ein Überdruck ausbildet, durch den die durchstechbaren Verschlußstücke 14 und 16 aus den Öffnungen an dem Zentrifugierbehälter 12 herausgedrückt werden könnten.

Das flüssige Filtermedium kann irgendein beliebiges flüssiges Filtermedium sein, wie es in den zuvor genannten noch im Prüfungsverfahren befindlichen amerikanischen Patentanmeldungen beschrieben ist, das sich zur Bestimmung von pathogenen Mikroorganismen eignet. Im allgemeinen besteht ein solches flüssiges Filtermedium aus einer wäßrigen Lösung von löslichen Stoffen, die gegenüber den Mikroorganismen, die darin suspendiert werden, nicht toxisch sind. Es hat eine so ausreichend hohe Dichte, daß rote und weiße Blutzellen oder zertrümmerte Blutzellen darin suspendiert werden können. Es handelt sich vorzugsweise bei den gelösten Substanzen um nichtionische Substanzen. Das flüssige Filtermedium hat demzufolge eine Dichte, die größer als Blut ist, beispielsweise größer als etwa 1.06 g/ccm. Es lassen sich darin Blutzellen oder zerstörte Blutzellen suspendieren, pathogene Mikroorganismen werden jedoch davon aufgenommen. Zusätzlich ist in dem flüssigen Filtermedium

vorteilhaft eine geringe Menge eines wärmeempfindlichen Geliermittels enthalten.

Geeignete lösliche Substanzen, die in dem flüssigen Filtermedium 22 verwendet werden können, sind beispielsweise die Zucker, wie Saccharose, Glucose, Maltose, Fructose, Mannitol, Sorbitol und dergleichen. Im allgemeinen sollten in dem flüssigen Filtermedium 22 wenigstens etwa 40 Gew.-% an Zucker enthalten sein. Es ist möglich, Zucker in Konzentrationen bis zur Sättigung einzusetzen. Bevorzugt werden flüssige Filtermedien 22 eingesetzt, in denen die Zucker in einer Menge von etwa 40 bis 50 Gew.-% vorhanden sind. Zucker und speziell Saccharose sind die besonders vorteilhaft als gelöste Substanzen für das flüssige Filtermedium 22 einsetzbaren Stoffe. Das flüssige Filtermedium kann damit auf einem physiologischen pH-Wert, das ist bei 6,0 bis 7,0, gehalten werden und kann, wenn Gelatine zugegeben wird, im Autoklaven benutzt werden.

Es können für die erfundungsgemäßen Zwecke darüber hinaus beliebige gelöste Substanzen verwendet werden, vorausgesetzt, daß die resultierende Lösung eine höhere Dichte hat als rote Blutzellen und zertrümmerte rote Blutzellen, und daß sie gegenüber den pathogenen Mikroorganismen nicht toxisch wirkt. Zu den sonstigen geeigneten chemischen Substanzen gehört beispielsweise die unter der Gebrauchsbezeichnung Hypaque Natrium bekannte chemische Verbindung $C_{11}H_{18}I_3N_2NaO_4$ (Natriumsalz der 3,5-Diacetamido-2,4,6-trijodbenzoësäure). Man kann diese Substanz in der gleichen Konzentration in wäßriger Lösung einsetzen, wie dies zuvor für die Zucker angegeben worden ist. Eine weitere Gruppe von gelösten Substanzen, die man zur Herstellung des flüssigen Filtermediums für die Zwecke der vorliegenden Erfindung einsetzen kann, sind makromolekulare lösliche Stoffe, die in wäßrigem Medium die Struktur eines flüssigen Gels anzunehmen vermögen und deren Porengröße klein genug ist, um zu verhindern, daß die roten Zellen und die Zertrümmerungsstücke der roten Zellen hindurchzutreten vermögen, aber groß genug ist, um den pathogenen Mikroorganismen den Durchtritt zu ermöglichen.

Ein Beispiel für eine solche geeignete makromolekulare lösliche Substanz ist ein wasserlösliches vernetztes Polymer, das über das löslich gemachte Netzwerk verteilt mikroporöse Öffnungen besitzt. Ein solches geeignetes wasserlösliches Polymer ist beispielsweise ein Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht im Bereich von etwa 30 000 bis etwa 500 000 und einer Intrinsic-Viskosität von etwa 0.17 dl/g, einer spezifischen Drehung $[\alpha]_D^{25} = -56.5^\circ$, das dialysierbares Material in einer Menge von weniger als 1 Gew.-% enthält. Ein solches brauchbares Polymer wird unter der Handelsbezeichnung "Ficoll" von der Firma Pharmacia Fine Chemicals, Inc., 800 Centennial Avenue, Piscataway, New Jersey, vertrieben. Ein anders Polymer dieser Art, das sich für die erfundungsgemäßen Zwecke verwenden läßt, ist Dextran, das ein durchschnittliches Molekulargewicht im Bereich von etwa 10 000 bis etwa 2 000 000, vorzugsweise von etwa 50 000, hat. Diese Polymeren wirken, gelöst in Wasser, für die erfundungsgemäßen Zwecke als ein flüssiges Filtermedium für pathogene Mikroorganismen. Anscheinend haben sie innerhalb ihres löslich gemachten Netzwerkes mikroporöse Öffnungen im Bereich von etwa 1 bis etwa 7 Mikron.

Das wasserlösliche Polymer oder die makromolekulare lösliche Substanz ist in der wäßrigen Lösung zweckmäßig in einer Menge im Bereich von etwa 10 bis 40

Gew.-% insbesondere im Bereich von etwa 20 bis 30 Gew.-% vorhanden.

Der Ausdruck "wärmeempfindliches Geliermittel" wird hier für irgendein Mittel verwendet, das die Fähigkeit hat, die als Filtermedium 2 verwendete wäßrige Lösung bei einer wesentlich unter Zimmertemperatur liegenden Temperatur zu gelieren, jedoch bei höheren Temperaturen, die die pathogenen Mikroben nicht zerstören, beispielsweise bei solchen unterhalb 50°C, die im allgemeinen nicht höher als etwa 42°C liegen, das Medium verflüssigen. Zu diesen geeigneten wärmeempfindlichen Geliermitteln gehören alle Geliermittel, die keine zerstörende Wirkung auf die Lösung oder die zu analysierende Probe haben. Beispiele für solche Materialien sind Gelatinen, das heißt die Proteine, die man durch Auskochen von Haut, Sehnen, Knorpel, Knochen und dergleichen mit Wasser aus Collagen erhält. Die wärmeempfindlichen Geliermittel können in beliebigen geeigneten Mengen, zum Beispiel zu etwa 0,5 bis etwa 5 Gew.-% des Filtermediums 22 verwendet werden.

Zusätzlich können in dem erfundungsgemäßen Gerät eine Einrichtung zum Ausspülen von Sauerstoff und/oder innerhalb des flüssigen Filtermediums ein Sauerstoffempfindlicher Farbstoff vorhanden sein. Durch die Ausspülung von Sauerstoff wird sichergestellt, daß im Innenraum des Misch- und Zentrifugiergerätes 10 anaerobe Bedingungen aufrechterhalten werden. Die Medizin befaßt sich mit durch anaerobe Bakterien verursachte Infektionen des menschlichen Körpers. Wenn man die Untersuchungen zur Isolierung und Bestimmung von pathogenen Mikroorganismen unter aeroben Bedingungen durchführt, dann ist es sehr wahrscheinlich, daß die anaeroben Bakterien nicht gefunden werden. Dementsprechend wird vorteilhaft für die Zwecke der vorliegenden Erfindung ein solches flüssiges Filtermedium 22 eingesetzt, in dem eine geringe wirksame Menge eines Reduktionsmittels (ein Mittel, das gebräuchlich ist zur Entfernung von Sauerstoff) vorhanden ist. Beispiele für solche Reduktionsmittel sind L-Cystin, Natriumthioglykolat und Ascorbinsäure und der gleichen. Bevorzugt setzt man für die Zwecke der vorliegenden Erfindung in dem flüssigen Filtermedium 22 ein Gemisch aus L-Cystin und Natriumthioglykolat ein. Es kann weiterhin vorteilhaft sein, eine geringe wirksame Menge eines Sauerstoffempfindlichen Farbstoffes in dem flüssigen Filtermedium vorzusehen. Der Farbstoff kann verwendet werden unabhängig davon, ob ein wie zuvor beschriebenes Reduktionsmittel vorhanden ist. Vorzugsweise verwendet man einen in Abwesenheit von Sauerstoff farblosen Farbstoff, dessen Farbe umschlägt, wenn er mit Sauerstoff in Kontakt kommt. Dann zeigt ein Farbumschlag an, daß Sauerstoff im Innenraum des Misch- und Zentrifugiergerätes 10 vorhanden ist. Dies ist ein Anzeichen für nachlassendes Vakuum im Innenraum des Gerätes. Beispiele für den vorliegenden Zweck brauchbare Sauerstoffempfindliche Farbstoffe sind Resazurin und Methylenblau. Es können jedoch auch beliebige andere Sauerstoffempfindliche Farbstoffe im erfundungsgemäßen Gerät benutzt werden, vorausgesetzt, daß sie das flüssige Filtermedium 22 nicht beeinträchtigen und den Vorgang der Abtrennung der Mikroorganismen, der innerhalb des Innenraums des Misch- und Zentrifugiergerätes 10 stattfindet, nicht stören. Ein flüssiges Filtermedium, wie es typischerweise für die erfundungsgemäßen Zwecke benutzt werden kann, hat beispielsweise folgende Zusammensetzung:

50%	(G/G) Saccharose
1,5%	(G/G) Gelatine
0,05%	(G/V) L-Cystin
0,05%	(G/V) Natriumthioglykolat
5 0,0001 bis 0,0002%	(G/V) Resazurin

Das Reduktionsmittel kann generell in einer Menge von etwa 0,01 bis etwa 0,2 Gew.-% des flüssigen Filtermediums betragen, und der Sauerstoffempfindliche Farbstoff kann etwa 0,001 bis etwa 0,0005 Gew.-% des flüssigen Filtermediums ausmachen.

In der Behandlungsflüssigkeit 18 können beliebige geeignete Bestandteile vorhanden sein, je nach dem, wie die Serum- oder Blutprobe behandelt werden soll, bevor die pathogenen Mikroorganismen daraus abgetrennt werden. Beispielsweise läßt sich bei einer speziellen Anwendung des erfundungsgemäßen Gerätes eine Behandlungsflüssigkeit 18 einsetzen, die aus einer wäßrigen Lösung eines Lysiermittels für Blut besteht. Man kann dazu ein beliebiges Lysiermittel in wäßriger Lösung verwenden, vorausgesetzt, daß dieses nicht toxisch für die Mikroorganismen ist. Ein Beispiel für solches Lysiermittel ist eine nichttoxische wäßrige Lösung von Saponin. Es muß darauf hingewiesen werden, daß viele Saponine für pathogene Mikroben toxisch wirkend angesehen werden. Wie jedoch in der noch im Prüfungsverfahren befindlichen amerikanischen Parallelanmeldung 4 23 447, eingereicht am 10. Dezember 1973 unter dem Titel US 38 83 425 "Detoxification of Saponins", deren Inhalt hiermit in die vorliegende Anmeldung einbezogen wird, ausgeführt ist, wurde eine neue Methode zur Entfernung der toxischen Bestandteile aus den bisher für toxisch gehaltene Saponinen entwickelt. Nach dieser in der genannten Parallelanmeldung beschriebenen Methode kann toxisches Saponinmaterial entgiftet werden, und das dabei gewonnene gereinigte Material läßt sich für die Zwecke der vorliegenden Erfindung verwenden.

Weiterhin kann die wäßrige Lösung ein Antikoagulans und/oder ein Mittel zum Ausspülen von Sauerstoff enthalten. Beispiele für bevorzugte Antikoagulantien sind Natriumpolyanetholsulfonat (SPS) und Heparin. Natriumpolyanetholsulfonat ist bevorzugt, weil es nicht nur als Antikoagulans wirkt, sondern auch die phagozytische Aktivität von Granulozyten und Monozyten sowie die normale antibakterielle Aktivität von Serum inhibiert.

Das Misch- und Zentrifugiergerät 10 bietet eine bequeme, nicht kostspielige und praktische Möglichkeit, wenn eine Testflüssigkeit, wie beispielsweise Blut, mit einer beispielsweise wie zuvor beschriebenen Behandlungsflüssigkeit zwecks Entfernung der pathogenen Mikroorganismen, die in der Testflüssigkeit möglicherweise vorhanden sind, zusammengebracht werden soll. Man kann dann die Testflüssigkeit mittels einer Injektionsnadel, die durch die Verstärkung 16b und die Membran 20 hindurchgedrückt wird, auf das flüssige Filtermedium 22 aufbringen. Wenn die Membran 20, die straff gespannt ist, von der Injektionsnadel durchstochen wird, zerreißt sie, und die Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 läuft dementsprechend, wenn die Testflüssigkeit 18 durch die Injektionsnadel in den evakuierten Innenraum 24 fließt, gleichzeitig in diesen ein. Dadurch entfällt die Notwendigkeit, die Serum- oder Blutprobe und die Behandlungsflüssigkeitsprobe in einem gesonderten Arbeitsgang zuvor zu vermischen. Die Möglichkeit einer zusätzlichen Verschmutzungsgefahr wird so vermieden.

Darüber hinaus wurde festgestellt, daß manche flüssigen Filtermedien unverträglich sind mit manchen Vorbehandlungsmitteln, wie beispielsweise zuvor erläuterten Lysiermitteln. Es ist daher nicht möglich, die Behandlungsflüssigkeitsprobe und das flüssige Filtermedium über längere Zeitspannen miteinander kombiniert in dem Innenraum des Misch- und Zentrifugiergerätes zu halten. Daher hat die zerreißbare Membran nicht nur die Aufgabe, die Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 von dem flüssigen Filtermedium 22 getrennt zu halten, sondern sie gibt auch die Möglichkeit, die Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 zu dem Zeitpunkt, an dem sie bei dem Verfahren zur Ermittlung der pathogenen Mikroorganismen benötigt wird, rasch freizusetzen. Es ist nicht erforderlich, daß es sich bei der zerreißbaren Membran 20 um eine gasundurchlässige Membran handelt. Es genügt, wenn diese Membran für die Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 und für das flüssige Filtermedium 22 undurchlässig ist und den Durchschritt dieser beiden Komponenten zu verhindern vermag. Die zerreißbare Membran 20 kann aus einem beliebigen gebräuchlichen elastomerem Material, wie beispielsweise Naturkautschuk oder synthetischen Elastomeren, zum Beispiel Polyisopren bestehen. Die zerreißbare Membran 20 kann in irgendeiner beliebigen Weise an der Öffnung des Ansatzes 16a befestigt sein. Vorzugsweise wird die zerreißbare Membran 20 gedehnt oder gespannt gehalten, wenn sie über den Ansatz 16a aufgebracht wird, damit sie reißt, wenn man sie mit der Spitze einer Injektionsnadel durchsticht. Die zerreißbare Membran 20 dient als für die Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 und für das flüssige Filtermedium 22 undurchlässige Sperre. Sie ist ausreichend flexibel, so daß sie die Gasausdehnung innerhalb der die Behandlungsflüssigkeitsprobe enthaltenden Kammer (Ansatz 16a) infolge Temperaturänderung und/oder infolge der Anwesenheit des Vakuums innerhalb des evakuierten Raums 24 aufzufangen vermag. Dieses flexible Verhalten ist in Fig. 1 in gestrichelter Linie 20a veranschaulicht. Die zerreißbare Membran 20 ist dort in gedehntem Zustand gezeigt.

Anhand der Fig. 2 bis 8 wird nachfolgend die Benutzung des erfundungsgemäßen Misch- und Zentrifugiergerätes 10 zur Untersuchung auf pathogene Mikroben erläutert. Das flüssige Filtermedium 22 kann beispielsweise 1,5 ml einer wäßrigen Lösung sein, die 3,0 Gewichtsteile Gelatine, 97,0 Gewichtsteile L-Cystin, 0,8 Gewichtsteile Natriumthioglykolat und 0,0003 Gewichtsteile Resazurin enthält.

Die Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 kann irgendeinen geeigneten Bestandteil enthalten, beispielsweise ein Lysiermittel und/oder ein Antikoagulans und gewünschtenfalls in einer beliebigen gewünschten Konzentration ein Mittel zum Ausspülen von Sauerstoff oder ein Reduktionsmittel. Man kann das Antikoagulans in einer beliebigen für die jeweilige Blutprobe ausreichenden Menge und die Lysiermittel in einer die Blutprobe ausreichend löslich machenden Menge einsetzen. Beispielsweise kann man als Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 0,3 ml einer wäßrigen Lösung verwenden, die etwa 12 Gew.-% nicht-toxisches Saponin und etwa 2 Gew.-% Natriumpolyetholsulfonat enthält. Zunächst wird das Misch- und Zentrifugiergerät 10, wie in Fig. 2 veranschaulicht, in aufrechter Stellung angeordnet, und man läßt das flüssige Filtermedium 22 nach unten auf das durchstechbare Verschlußstück 14 einlaufen. Dann bringt man das Misch- und Zentrifugiergerät 10 in einen geeigneten Kühler, beispielsweise einen Eisschrank, und kühlte soweit ab, daß die Gelatine das flüssige Filterme-

dium 22 verfestigt. Man kann beispielsweise das Misch- und Zentrifugiergerät 10 auf 4°C abschrecken. Diese Arbeitsstufe ist in Fig. 3 veranschaulicht. Als nächstes wird eine Testprobe genommen, beispielsweise wird eine Blutprobe (zum Beispiel 8 ml) auf eine mit einer Injektionskanüle 28 bestückte Injektionsspritze aufgezogen. Die Injektionskanüle 28 wird dann durch die Verstärkung 16b, die Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 in dem Ansatz 16a und die zerreißbare Membran 20 hindurchgesteckt. Dadurch wird die Membran 20 zerrissen, und die Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 fließt in den evakuierten Raum 24 ein. Die Blutprobe wird dann in der wie in Fig. 4 veranschaulichten Art in den Innenraum des Misch- und Zentrifugiergerätes 10 eingespritzt. Durch die von dem in den evakuierten Raum 24 eingebrachten Blut verursachte Turbulenz wird das flüssige Filtermedium 22 nicht in Unordnung gebracht. Es bleibt, wie in Fig. 4 veranschaulicht, als verfestigte Bodenschicht erhalten. Die durch das Blut, während es in den evakuierten Raum 24 injiziert wird, verursachte Turbulenz führt jedoch dazu, daß die Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 und die Blutprobe vollständig miteinander vermischt werden und als Ergebnis das Gemisch 30 gebildet wird.

Beim Vermischen der Blutprobe mit der das Lysierungsmittel enthaltenden Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 werden die roten Blutzellen lysiert. Dies verhindert ein mögliches Eingeschlossenwerden von Erythrozyten. Unter einem solchen Einschluß versteht man im allgemeinen die Tatsache, daß die Erythrozyten oder Lymphocyten während des Zentrifugiervorgangs an der Oberfläche des flüssigen Filtermediums geschichtet werden und die geschichteten bzw. gestapelten Zellen pathogene Mikroorganismen einschließen, während sie beim Zentrifugieren nach unten wandern. Solche pathogenen Mikroorganismen können nicht in das flüssige Filtermedium gelangen. Aus diesem Grund setzt man zum Beispiel das als Antikoagulans wirkende Natriumpolyetholsulfonat der Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 zu. Dieses inhibiert die phagocytische Aktivität von Granulozyten und Monozyten und die normale antibakterielle Aktivität des Serums, wenn es mit der Blutprobe vermischt wird.

Danach wird die Injektionskanüle 28 aus dem durchstechbaren Verschlußstück 16 herausgezogen, und das Misch- und Zentrifugiergerät 10, welches das koagulierte flüssige Filtermedium 22 und das in den Fig. 4 und 5 gezeigte Gemisch 30 aus der Zusammenmischung der Blutprobe mit der Behandlungsflüssigkeitsprobe 18 enthält, wird in der aufrechten Stellung soweit erhitzt, daß die Gelatine schmilzt und das flüssige Filtermedium 22 verflüssigt. Dabei wird das Misch- und Zentrifugiergerät 10 auf eine solche Temperatur erhitzt, bei der pathogene Mikroorganismen, die möglicherweise in der Blutprobe vorhanden sind, nicht zerstört werden, die jedoch ausreicht, um die Gelatine flüssig zu machen. Beispielsweise kann das Misch- und Zentrifugiergerät 10 in der in Fig. 5 veranschaulichten Stellung durch Einsetzen in ein auf eine Temperatur von etwa 37 bis 42°C eingestelltes Wasserbad erhitzt werden. Infolge der Verflüssigung der in dem flüssigen Filtermedium 22 vorhandenen Gelatine entsteht eine flüssige Lösung, die sich nun in dem für die Wirkung als Filtermedium für pathogene Mikroorganismen bereiten Zustand befindet.

Die vollständige Abtrennung der pathogenen Mikroorganismen aus dem verbleibenden Anteil der Blutprobe geschieht in der Weise, daß man das Misch- und Zentrifugiergerät 10 in eine geeignete Zentrifugenvor-

richtung einsetzt und mit einer so ausreichenden Kraft zentrifugiert, daß sich die pathogenen Mikroorganismen von den übrigen Bestandteilen der Blutprobe abscheiden. Zentrifugier-Geschwindigkeit und Zeit können stark variieren, je nach der Festigkeit des Materials, aus dem der Behälter 12 besteht und je nach dem Typ der Zentrifugenvorrichtung. Das Zentrifugieren kann in üblicher Weise erfolgen. Das Misch- und Zentrifugiergerät 10 kann Gravitationskräfte von etwa 100 bis etwa 6000 und vorzugsweise von etwa 1400 bis 5000 ausgesetzt werden. Vorteilhaft läßt sich eine Schwingbecher-Umlaufzentrifuge verwenden, in der 10 bis 20 Minuten lang Gravitationskräfte von etwa 2000 bis 4000 einwirken. Der Zentrifugievorgang ist schematisch in Fig. 6 veranschaulicht.

Nachdem das Misch- und Zentrifugiergerät wie zuvor beschrieben der Zentrifugierbehandlung ausgesetzt worden ist, führt man durch die durchstechbare Verstärkung 14b des durchstechbaren Verschlußstückes 14 eine mit einer kurzen Injektionskanüle 34 ausgerüstete sterile Injektionsnadel 32 ein, wie dies in Fig. 7 veranschaulicht ist. Wie gezeigt ist, befindet sich an der Injektionskanüle 34 ein Stopfstück 34a, durch das die Eindringtiefe der Nadel 34 in das flüssige Filtermedium 22 über dem konisch verjüngten Ansatzstück 14a begrenzt ist. Nach der Einführung der Injektionskanüle entnimmt man mit der Injektionsspritze 32 flüssiges Filtermedium 22 aus dem Innenraum des Misch- und Zentrifugiergerätes 10. Darin wird nur noch das restliche Probenlösungsge- misch 30 belassen. Wie man erkennt, ist die Injektionskanüle 34 so lang, daß sie die Verstärkung 16b des durchstechbaren Verschlußstückes 16 nicht vollständig zu durchdringen vermag. Mit dieser Dimensionierung wird sichergestellt, daß ein zufälliges Durchstechen und eine Zerstörung des Vakuums sowie ein Eindringen in den sterilen Innenraum des Misch- und Zentrifugiergerätes 10 mittels der kurzen Kanüle 34 nicht möglich ist.

Man kann selbstverständlich auch eine längere Injektionskanüle für die Injektionsspritze 32 vorsehen, und man kann diese Kanüle bis zu einer kurz hinter der Trennfläche zwischen dem flüssigen Filtermedium 22 und dem Probengemisch 30 gelegenen Stelle einführen und da Probengemisch zuerst aus dem Tubus entnehmen. Aber diese Ausführungsform ist weniger bevorzugt. In diesem Fall sollte die Injektionsspritze zweckmäßig zunächst bei zurückgezogenem Kolben mit steriler Luft gefüllt werden, damit sterile Luft in dem Maße in den Innenraum des Misch- und Zentrifugiergerätes 10 eingedrückt werden kann, wie die Probengemischschicht entfernt wird. Danach kann dann das flüssige Filtermedium 22 entfernt werden.

Nachdem das flüssige Filtermedium 22 mittels der Injektionsspritze 32 abgezogen worden ist, wird es vorteilhaft zunächst in Bewegung gebracht, beispielsweise geschüttelt. Dadurch werden die pathogenen Mikroorganismen gut durchgemischt und darin vollständig gleichförmig verteilt. Anschließend wird das flüssige Filtermedium 22, in dem die pathogenen Mikrobakterien dispergiert sind, auf einem zum Züchten der Bakterien geeigneten Nährmedium verteilt. Dieser Vorgang ist schematisch in Fig. 8 veranschaulicht. Für diese Zwecke geeignete Nährmedien sind beispielsweise in der parallel anhängigen Anmeldung mit dem Titel "Detection of Microbial Pathogens" beschrieben, auf die zuvor bereits Bezug genommen worden ist.

Wenn man beispielsweise $1\frac{1}{2}$ ml an pathogene Mikroorganismen enthaltendem flüssigem Filtermedium zur Verfügung hat, kann man davon 0.2 ml im Platten-

test auf einer Blutagarplatte, die bei 37°C in aerober Atmosphäre inkubiert wird, untersuchen. Auf eine andere Blutagarplatte können 0.2 ml der wäßrigen Lösung ausgestrichen und bei 37°C in anaerober Umgebung inkubiert werden. Weitere 0.3 ml der Lösung können für einen Platten-Test auf Sabouraud-Agar aufgestrichen und bei 25°C unter aeroben Bedingungen begrütet werden. Weitere 0.2 ml Lösung können auf eine EMB-Platte (Eosin-Methylenblau-Farbstoff) aufgestrichen und bei 37°C auf einem Objektträger bebrütet werden. Weitere 0.5 ml der Lösung können in ein flüssiges Thioglykolatmedium eingebracht und darin bei 37°C bebrütet werden. Die Nährböden können zur Bestimmung der vorhandenen Kolonieformen täglich untersucht werden.

15 Man kann die Anzahl der in 1 ml des Blutes vorhandenen pathogenen Mikroorganismen bestimmen, wenn man die Anzahl der Kolonien mit einem Korrekturfaktor multipliziert. In diesen Korrekturfaktor gehen die Wachstumszeit für einen bestimmten Organismus, die 20 eingesetzten Volumina an Blut- und Flüssigfilter-Flüssigkeit und die Menge an aufgestrichener Endmischung ein. In dem zuvor angegebenen allgemeinen Beispiel ist der Korrekturfaktor 1,56.

Das in der Zeichnung dargestellte Misch- und Zentrifugiergerät 10 ist eine vorzugsweise Ausführungsform des erfindungsgemäßen Gerätes, die sich insbesondere zur Durchführung der Abtrennung von pathogenen Mikroorganismen aus Proben von Körperflüssigkeit verwenden läßt. Es lassen sich selbstverständlich auch andere Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Gerätes mit etwas unterschiedlichen Konfigurationen verwenden. Beispielsweise kann man das erfindungsgemäße Gerät auch so ausbilden, daß nur ein durchstechbares mit einem Ansatz 16a und einer darüber angeordneten dünnen zerreißbaren Membran versehenes Verschlußstück an einem Ende des länglichen Zentrifugier-Tubus vorhanden ist, während das gegenüberliegende Ende einstückig geschlossen mit der Tubuswand ausgebildet ist, das heißt der Tubus ein Prüfröhrchen darstellt. Man kann dann die Probenflüssigkeit in den evakuierten Innenraum in dem Röhrchen einspritzen und mit der Behandlungsflüssigkeit, wie schematisch in Fig. 4 veranschaulicht, automatisch mischen. In dieser Weise können zahlreiche verschiedene Behandlungsflüssigkeiten 35 proben mit unterschiedlichen Arten von Testflüssigkeiten in einer einzigen Arbeitsstufe vermischt werden. In solchen Fällen kann gewünschtenfalls eine zweite Flüssigkeit in dem Prüfröhrchenteil des Gerätes vorhanden sein, so daß, wenn eine Probe in das Gerät injiziert wird, sich diese automatisch mit zwei verschiedenen Flüssigkeiten vermischen kann, die, wenn man sie zusammen aufbewahrt, miteinander unverträglich sind.

Das erfindungsgemäße Misch- und Zentrifugiergerät ist insbesondere brauchbar für solche Verfahren, die dazu dienen, pathogene Mikroorganismen zu ermitteln und zu bestimmen. Es besteht, allgemein gesagt, aus einem länglichen abgeschlossenen Zentrifugier-Raum, der evakuiert ist und mit mindestens an einem Ende angeordnetem durchstechbarem Verschlußstück ausgerüstet ist, worin sich eine abgeschlossene Kammer für die Behandlungsflüssigkeit befindet, die anschließend an das durchstechbare Verschlußstück und durch eine dünne zerreißbare Membran von dem evakuierten Raum abgetrennt gehalten wird. In der evakuierten Kammer befindet sich eine sterile wäßrige Lösung, die eine größere Dichte hat als eine Testflüssigkeit, und die aus der Testflüssigkeit darin enthaltene pathogene Mikrobakterien selektiv aufzunehmen vermag. Die Testflüssigkeit

wird mittels einer Injektionsnadel auf die sterile wäßrige Lösung aufgebracht. Dazu wird die Injektionsnadel durch das durchstechbare Verschlußstück, die in der Behandlungsflüssigkeits-Kammer vorhandene Behandlungsflüssigkeit und die zerreißbare dünne Membran 5 hindurchgeführt, so daß die Behandlungsflüssigkeitsprobe in Kontakt kommt mit der Testprobe, wenn diese aus der Injektionsnadel austritt und sich auf dem flüssigen Filtermedium absetzt.

10

Hierzu 1 Blatt Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

50

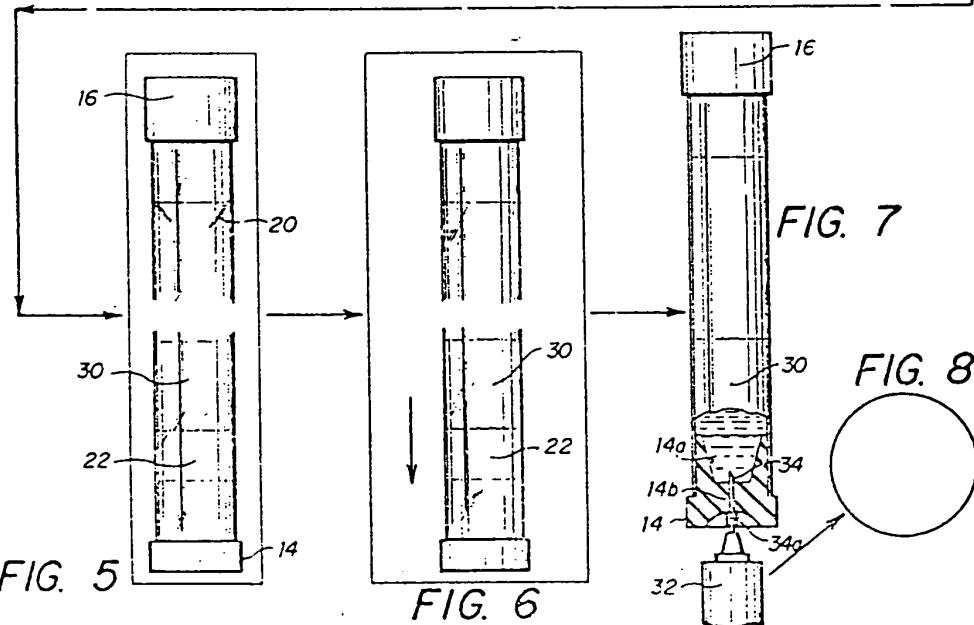
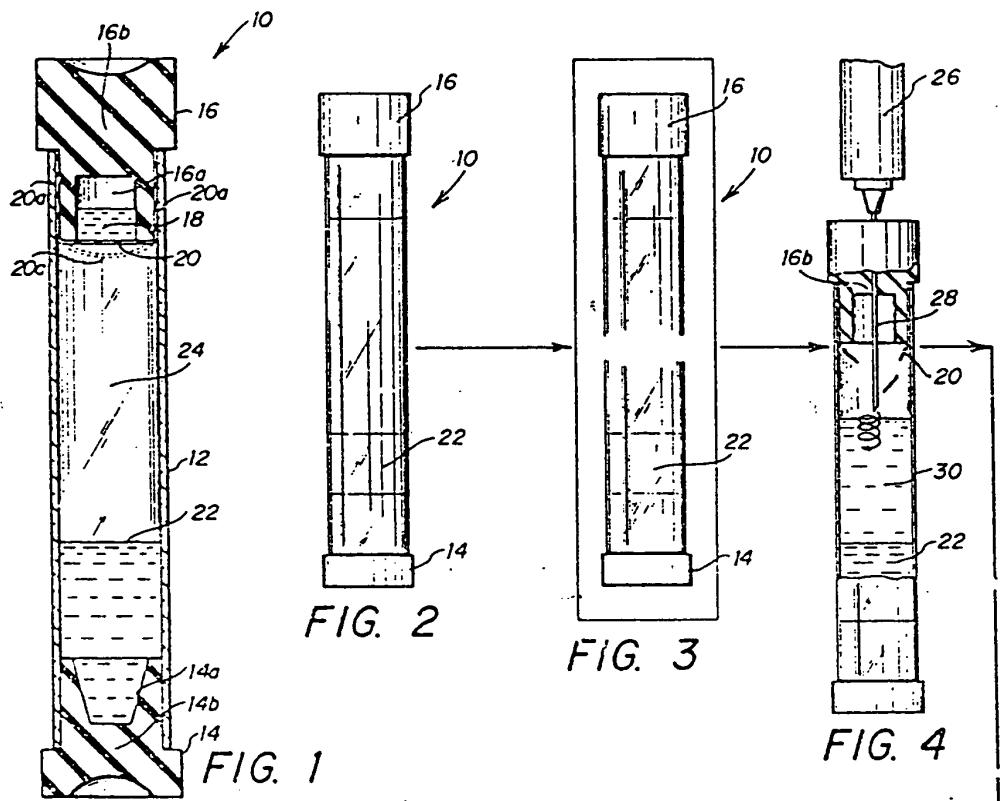
55

60

65

- Leerseite -

THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)